

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Silvija Črnjević

Zakorjenjivanje i aklimatizacija crnoplodne aronije
(*Aronia melanocarpa* Michx.) razmnožene u uvjetima *in vitro*

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Diplomski rad izrađen je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Pevalek-Kozlina i pomoćnim vodstvom dr. sc. Marije Babić te je predan na ocjenu Biološkom odsjeku radi stjecanja zvanja prof. biologije i kemije.

Veliko hvala voditeljici prof. dr. sc. Branki Pevalek-Kozlina na razumijevanju, cjelokupnoj pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada. Želim također zahvaliti pomoćnoj voditeljici dr. sc. Mariji Babić bez koje ne bih sama uspjela napraviti eksperimentalni dio ovog rada te na velikoj pomoći, savjetima prilikom pisanja ovog rada i iskrenom prijateljstvu.

Veliko hvala mojim roditeljima i sestri koji su uvijek tu, puni razumijevanja i velika podrška, te ostalim, meni, dragim osobama: Vjeranu; Željki, Anamariji, Marini i ostalim PBK kolegama/icama na prijateljstvu, lijepim trenucima, potpori i razumijevanju tijekom studija.

Posebno hvala kumi Mariji na trudu i mucu oko prevođenja radova.

Zahvaljujem se Ivanu i Ivani za fotografije.

Silvija

Popis kratica korištenih u tekstu:

IAA – indol-3-octena kiselina

IBA – indol-3-maslačna kiselina

NAA – α -naftalenoctena kiselina

2,4-D - 2,4-diklorofenoksioctena kiselina

2,4,5-T – 2,4,5-triklorofenoksioctena kiselina

4 Cl-IAA – 4-klorofenoksioctena kiselina

PAA – feniloctena kiselina

GA_n – giberelini

BA – 6- benzilaminopurin

IPA - izopentenil-adenin

MS – Murashige i Skoog

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Silvija Črnjević

Department of Botany, Faculty of Science
University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Michx.) is a deciduous bush-like plant which belongs to the Rosaceae family. The species was introduced in *in vitro* culture due to high antioxidative activity of their fruits.

Rooting and subsequent acclimatization of black chokeberry has been investigated on MS nutrient media containing different concentration of macronutrients (MS, ½ MS, ¼ MS). The highest rooting percentage (85.4%) and the best morphological characteristics were obtained on ½ MS medium. Therefore, the research was continued on ½ MS, supplemented with auxins α -naphthaleneacetic acid (NAA) or indole-3-butyric acid (IBA). Auxins NAA or IBA inhibited the main root induction, but stimulated adventitious root formation from the callus. Maximum adventitious rooting occurred in shoots grown on ½ MS containing 1.5 mg/L NAA (95.8%) or 1.0 mg/L IBA (100%). Acclimatization of *in vitro* rooted microcuttings was equally successful (80-90%) in plants potted to commercial peat substrate (COMPO SANA) and mixture of pumice, perlite and peat (3:3:1). *Aronia melanocarpa* microcuttings without roots exhibited poor *ex vitro* rooting and low acclimatization percentage (50-60%).

(40 pages, 37 figures, 2 tables, 38 references, original: in Croatian)

The graduation thesis is stored in Central Biological Library, Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: *Aronia melanocarpa*, micropropagation, MS, rooting, acclimatization

Supervisor: Dr. Branka Pevalek-Kozlina, full professor
Dr. Dubravka Matković-Čalogović (KO), full professor
Dr. Biserka Prugovečki (KO) , assistant professor
Dr. Ines Radanović, associated professor

Replacement: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, assistant professor

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Silvija Črnjević

Botanički zavod Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa* Michx.) je listopadni grm iz porodice *Rosaceae*. Zbog izvanrednih antioksidacijskih svojstava plodova, vrsta je uvedena u kulturu *in vitro*.

U ovom radu prikazani su rezultati istraživanja zakorjenjivanja i aklimatizacije crnoplodne aronije na hranjivoj podlozi MS s različitim koncentracijama makroelemenata (MS, ½ MS i ¼ MS). Najveća stopa zakorjenjivanja (85,4%) te najbolje morfološke značajke biljaka postignute su na podlozi ½ MS. Istraživanje je nastavljeno na ½ MS uz dodatak auksina α -naftalenoktene kiseline (NAA) i indol-3-maslačne kiseline (IBA). Dodani auksini inhibirali su stvaranje primarnog te potaknuli stvaranje adventivnog korijenja iz prethodno nastalog kalusnog tkiva. Na podlozi s 1,5 mg/L NAA stopa adventivnog zakorjenjivanja iznosila je 95,8%, a na podlozi s 1,0 mg/L IBA postotak adventivnog zakorjenjivanja iznosio je 100%. Aklimatizacija *in vitro* zakorjenjenih biljaka bila je podjednako uspješna (u 80-90% biljaka) na komercijalnom (COMPO SANA) i na pripremljenom supstratu (mješavina pumice, tenisit i treseta u omjeru 3:3:1).

Zakorjenjivanje izdanaka *ex vitro* provedeno je na istim supstratima uz istovremenu aklimatizaciju, te se pokazalo manje uspješnim (u 50-60% biljaka) od aklimatizacije biljaka prethodno zakorjenjenih u uvjetima *in vitro* (u 80-90% biljaka).

(40 stranica, 37 slika, 2 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Ključne riječi: *Aronia melanocarpa*, mikropropagacija, MS, zakorjenjivanje, aklimatizacija

Voditelj: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina

Pomoćni voditelj: Dr. sc. Marija Babić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina
Prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović (KO)
Doc. dr. sc. Biserka Prugovečki (KO)
Prof. dr. sc. Ines Radanović

Zamjena: Doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. <i>Aronia melanocarpa</i> Michx. – porijeklo i rasprostranjenost.....	2
1.2. Morfološke značajke vrste <i>Aronia melanocarpa</i> Michx.....	3
1.3. Aronija – lijek budućnosti?	5
1.4. Razmnožavanje aronije u kulturi biljnog tkiva.....	7
1.4.1. Uvođenje aronije u kulturu <i>in vitro</i>	8
1.4.2. Umnožavanje izdanaka aronije u uvjetima <i>in vitro</i>	9
1.4.3. Zakorjenjivanje izdanaka aronije uzgojenih u uvjetima <i>in vitro</i>	9
1.4.4. Aklimatizacija aronije uzgojene u uvjetima <i>in vitro</i>	9
1.5. Dosadašnja istraživanja vrste <i>Aronia melanocarpa</i> Michx.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Biljni materijal.....	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima <i>in vitro</i> i aklimatizacija.....	14
3.2.2. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima <i>ex vitro</i> i aklimatizacija.....	16
3.2.3. Statistička obrada rezultata.....	17
4. REZULTATI.....	18
4.1. Odabir osnovne hranjive podloge.....	19
4.2. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima <i>in vitro</i>.....	20
4.3. Aklimatizacija aronije zakorjenjene u uvjetima <i>in vitro</i>.....	24
4.4. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima <i>ex vitro</i> i aklimatizacija.....	26
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. LITERATURA.....	35
8. PRILOZI.....	38

I. UVOD

1.1. *Aronia melanocarpa* Michx. – porijeklo i rasprostranjenost

Nije poznato kada se uistinu počelo s uzgojem ove nadasve zanimljive i ljekovite biljne vrste. Međutim, pouzdano se zna da je u Europu stigla iz istočnog dijela Sjeverne Amerike. Navodno su je prvi počeli upotrebljavati sjevernoamerički Indijanci otkrivši u njoj hranu i lijek. Kako plodovi aronije dugo vremena ostaju u grmu i ne kvare se, Indijanci su se njima hranili, plodove su sušili i mljeli te miješali sa životinjskom mašću i osušenim mesom. Zimi su od osušenih plodova radili pogače, razne lijekove protiv želučanih i crijevnih tegoba te proljeva. Osim zrelih plodova, kao lijek su upotrebljavali listove i koru aronije.

U početku se ova biljka uzgajala isključivo zbog dekorativnosti jer su njezini bijeli cvjetovi jedni od najljepših cvjetova naših grmolikih biljaka, čija raskoš dolazi do izražaja tijekom mjeseca svibnja, kada aronija i cvate (Slika 1A i B). Sama cvatnja traje samo 5 do 6 dana. Zbog svega navedenog, ova biljka prvenstveno je bila poznata kao biljka s estetsko–dekorativnim svojstvima, a tek kasnije otkrivena je njezina ljekovitost.



Slika 1. (A) Cvat i (B) cvijet aronije.

U jesen, njezini listovi poprimaju karakterističnu crvenu boju. Upravo zbog svoje ljepote, 1972. godine crnoplodna aronija primila je nagradu Kraljevskog vrtlarskog udruženja u Engleskoj (www.aronija.com.hr).

Danas je aronija dobro poznata i priznata voćna vrsta u nekim područjima Kanade i u istočnom dijelu SAD-a do Floride, a u novije vrijeme se podižu probne plantaže na području Ukrajine, Češke, Bugarske, Njemačke i Skandinavije, te naročito u Rusiji, Finskoj i Švedskoj gdje je aronija, upravo zbog visokog stupnja otpornosti na niske temperature široko rasprostranjena (Slika 2).

Prije 20 godina u većem broju posađena je i u Sloveniji, međutim, nije bila posebno prihvaćena prije svega zbog nepoznavanja ljekovitih svojstava koja nudi.



Slika 2. – Plantaže aronije A) i B)

Aronija je novo voće koje se zbog svojih svojstava svrstava u prvorazredne prehrambene namirnice današnjice. Često se naziva i eko-bobičasto voće, a naveliko se primjenjuje u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

1.2. Morfološke značajke vrste *Aronia melanocarpa* Michx.

Crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa* Michx.) je listopadni grm iz porodice ruža (*Rosaceae*) koji odlikuje bujan rast. Pravilnom rezidbom može se oblikovati kao manje drvo (Slika 3A). Odlikuje se jajolikim, tamnozelenim kožastim listovima čija dužina iznosi 8 cm, a širina 5 cm. (Slika 3B). U jesen, listovi poprimaju posebnu žarko crvenu boju.



Slika 3. – (A) Sadnica aronije (Foto: S. Črnjević), (B) tamnozeleni listovi aronije s nezrelim plodovima u travnju (Foto: I. Radosavljević)

Aronija je nezahtjevna i vrlo se lako prilagođava uvjetima na staništu. Otporna je na niske zimske temperature (do -47°C) i zato je još nazivaju „sibirskom borovnicom“. Otporna je i na kasne proljetne mrazove, a može rasti i u manje plodnom tlu koje ipak ne smije biti previše kamenito, močvarno ili preplitko. Podjednako dobro uspijeva u kontinentalnom i mediteranskom podneblju. Ne ovisi previše o pH vrijednosti podloge, ne zahtjeva pretjeranu njegu ni prskanje jer je otporna na nametnike i štetnike, a nema ni značajnijih bolesti pa se nesmetano može uzgojiti bez pesticida. U plodnoj, vlažnoj zemlji ili vrtu doseže visinu od 1,5 do 3 m.

Plodovi rastu u grozdovima, ne osipaju se, već ostaju na biljci i do 2 mjeseca (Slika 4A). U početku su crvene boje što naročito privlači kukce i pčele. Dozrijevaju relativno brzo, kroz 80-ak dana. Krajem kolovoza i početkom rujna počinju poprimati ljubičasto-crnu boju (Slika 4B). Plod je boba promjera 1,5 cm i težine 1 do 1,5 g. Plodovi se mogu jesti i sirovi, ali zbog tipično slatkasto-kiselkastog, pomalo trpkog okusa, najčešće se prerađuju u sokove, pekmeze, džemove, kompote, jogurte i voćne slastice, likere, vina i dr. Zrele bobice mogu se sušiti ili zamrzavati te koristiti za kolače, peciva, kruh i ostale pekarsko-slastičarske proizvode (Prilog 1).



Slika 4. – (A) Plodovi aronije na početku berbe i (B) u kasnu jesen.

Aronija se plantažno sadi u razmaku od 0,7 do 1 metar čime se ostvaruju iznimno visoki prinosi. Samoplodna je, rodi treće godine nakon sadnje i ostvaruje prinos od 10 do 15 kg po grmu, a njezina puna produktivnost traje nešto više od 20 godina. Svakih nekoliko godina potrebno je prorijediti starije grane, jer ukoliko se ne prorijede, smanjuje se količina svjetlosti koja dopire do njih, a time i produktivnost same biljke (www.borovnicaunas.hr).

1.3. Aronija – lijek budućnosti?

Već 1980. godine ruski znanstvenici su počeli proučavati ljekovita svojstva aronije. Plodove aronije su ubrali na 17 000 ha za masovnu proizvodnju džemova, sokova i vina na području Rusije (Jeppsson, 2000).

Otkrili su da zreli plodovi aronije ljekovito djeluju na gastrointestinalni sustav. Povoljno djeluje na jetru pomažući joj da neutralizira štetne produkte, stimulira njenu regeneraciju, potiče izlučivanje žuči te smanjuje upale uzrokovane žučnim kamencima, žučnim pijeskom ili žuticom. U želucu i crijevima smiruje grčeve i bolove te upalu sluznice, zaustavlja dijareju. Aronija pomaže kod šećerne bolesti tako da smanjuje razinu šećera u krvi, pomaže u bolestima štitne žlijezde te gušavosti, poboljšava i regulira rad hormona štitnjače te jača imunološki sustav.

Istraživanja su pokazala da poboljšava vensku cirkulaciju krvi, smanjuje visoki krvni tlak, poboljšava cirkulaciju krvi u mozgu i očima zbog čega pomaže kod glavobolje i migrene te poboljšava vid. Također, niz istraživanja ruskih znanstvenika pokazala su da aronija pospešuje izlučivanje teških metala kao i nekih radioaktivnih elemenata iz tijela. Upravo su je zbog toga koristili u velikoj mjeri nakon nuklearne katastrofe u Černobilu kada su plodovi aronije korišteni za ublažavanje zdravstvenih tegoba ozračenih ljudi. Aronija je, zbog svog preventivnog i ljekovitog svojstva plodova svrstana među ljekovito bilje.

Zreli plodovi aronije sadrže veliku količinu antocijana (biljni pigmenti koji aroniji daju plavo-ljubičasto obojenje, Slika 5), fenola (biljni spojevi koji sadrže hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu) i tanina (fenolni polimeri koji imaju obrambena svojstva) (www.wikipedia.com).



Slika 5. – Tamna boja plodova potječe od antocijana

Antocijani štite animalne i humane stanice od oksidacijskog oštećenja i kancerogene degeneracije. Raznim istraživanjima otkriveno da je u 100 g svježih bobica sadržano od 725-800 mg (Jeppsson, 2000) do 1480 mg antocijana (www.aronija.com.hr) što je među najvećim vrijednostima izmjerenim u biljkama. Iz podataka istraživanja koje je provelo Ministarstvo poljoprivrede SAD-a (United States Department of Agriculture, USDA) jasno je vidljivo da je količina antioksidanasa u aroniji znatno veća nego u popularnijim namirnicama kao što su brusnica ili kupina (Slika 6; www.antioxidant-fruits.com).



Slika 6 – Antioksidacijski kapacitet pojedinih vrsta iz porodice *Rosaceae*

Fenoli koje sadrži aronija pospješuju zarastanje rana, odstranjuju toksine iz tijela, smanjuju upale i visok krvni tlak, povećavaju elastičnost krvnih žila te sprečavaju njihovo začepljenje.

Zreli plodovi sadrže i veliku količinu karotena (narančasto do crveno obojeni pigmenti topivi u mastima) koji štite kožu od opasnih opekline sunca te pozitivno djeluju na stanice oka sprečavajući nastanak sive mrežnice.

U plodovima aronije sadržana je velika količina vitamina (A, C, P, B₂, B₆, B₉, B₁₂, E, proA) i minerala (Ca, Fe, Mo, Mn, Cu, I, Co, K, P). Zbog svega navedenog, plodovi aronije i njezini pripravci (sokovi, vina, džemovi itd.) preporučaju se bolesnicima oboljelim od raka, bolesnicima podvrgnutim težim operacijama i svima koji su preboljeli neku bolest.

1.4. Razmnožavanje aronije u kulturi biljnog tkiva

Dugo godina kultura biljnog tkiva smatrala se kao "posebna oblast", odnosno odvojena od drugih znanstvenih disciplina. Međutim, danas ona pruža širok spektar tehnologija s mnoštvom disciplina, od propagacije i konzervacije do genetičkih manipulacija i razvijanja biotehnologija za otkrivanje farmaceutskih proizvoda (Ružić i Cerović, 2002). Možemo reći da kultura *in vitro* predstavlja najmoćnije oružje moderne genetike i molekularne biologije u cilju istraživanja rasta i razvoja biljaka te biokemije i fiziologije njihovih sekundarnih metabolita (Mededović i Ferhatović, 2003).

Kultura biljnih stanica i tkiva je metoda laboratorijskog uzgoja stanica, tkiva, organa i čitavih organizama na umjetnim hranjivim podlogama i u aseptičkim (sterilnim) uvjetima (Jelaska, 1994). Česti sinonim za kulturu biljnog tkiva je mikropropagacija (Ružić i Cerović, 2002), a temelji se na totipotentnosti biljnih stanica koje zadržavaju latentni kapacitet regeneracije biljke (George i Sherrington, 1984). Sam naziv *in vitro* označava uzgoj kultura u staklenim ili prozirnim plastičnim posudama. Postupak osigurava vrlo brz proces dobivanja velikog broja biljaka, koje su istovjetne po razvoju, rastu i genetičkom potencijalu vrste (Pintarić, 2008).

U kulturi biljnog tkiva bitno je izabrati odgovarajuću hranjivu podlogu jer njezin sastav, kao i sastav biljnih hormona (regulatora rasta) uvelike utječe na rast izdanaka. Dodavanjem potrebnih tvari u odgovarajućem obliku i kombinacijama omogućeno je ostvarivanje kultura gotovo od svakog dijela biljnog tijela (Jelaska, 1994). Sve hranjive podloge sadrže mineralne soli, ugljikohidrate kao izvor energije (najčešće saharozu), vitamine (B₁, B₆ i nikotinska kiselina) i regulatore rasta koji zadovoljavaju prehrambene i fiziološke potrebe stanica u kulturi. Najčešća podloga koja se koristi je podloga po Murashige i Skoogu (MS, Murashige i Skoog, 1962) koja se uspješno primjenjuje za velik broj kultura. Ona se razlikuje od ostalih podloga po visokom sadržaju nitrata, kalija i amonijevih iona.

Bitnu ulogu u kulturi biljnog tkiva imaju regulatori rasta (auksini, giberelini, citokonini, etilen i apscizinska kiselina; Pevalek-Kozlina, 2002). O vrsti i namjeni kulture ovisi koji će se regulatori rasta, i u kojoj kombinaciji, dodavati.

Dodavanje auksina potiče stvaranje kalusa (tkivo koje nastaje neorganizirano proliferacijom stanica na segmentu biljnog organa – eksplantatu; Jelaska, 1994). Ako se kultura postavlja radi morfogeneze, najčešće se radi kombinacija auksina (NAA) i citokinina koji, općenito, potiču stanično dijeljenje i organogenezu. Veća koncentracija auksina i manja

koncentracija citokinina potiču razvoj korijena, dok manja koncentracija auksina i veća koncentracija citokinina potiču razvoj izdanaka (Vorkapić-Furač, 2008).

1.4.1. Uvođenje aronije u uvjete *in vitro*

Najvažnije je u ovoj fazi dobiti sterilni eksplantat (meristem, vegeacijski vršak, bočni pup i dr., Jelaska, 1994). Površinska sterilizacija eksplantata koji se uvodi u kulturu izvodi se tako da se tretiraju sredstvom za površinsku sterilizaciju. Najčešće se koristi 10% otopina varikine koja sadrži 4-6% natrijevog hipoklorita.

Površinska sterilizacija vrši se u specijalnom radnom prostoru sa sterilnim strujanjem zraka. Za uspješnost površinske sterilizacije izuzetno je važno da biljni materijal bude svjež (Pintarić, 2008).

1.4.2. Umnožavanje izdanaka aronije u uvjetima *in vitro*

Glavna je svrha ove faze postići umnožavanje eksplantata bez gubitka genetičke stabilnosti (Jelaska, 1994). Umnožavanje se obavlja na različite načine, a koji će način biti upotrijebljen ovisi o svakom specifičnom slučaju, o biološkim ograničenjima vrste i o stopi umnožavanja potrebnog za dobivanje željenog broja biljaka.

Prilagodba sastava hranjive podloge, a osobito sastava hormona i njihove međusobne ravnoteže, obično je najvažnija u regulaciji umnožavanja i regeneracije u uvjetima *in vitro* (Jelaska, 1994).

1.4.3. Zakorjenjivanje izdanaka aronije uzgojenih u uvjetima *in vitro*

Kultura *in vitro* je metoda kojom dobivamo veliki broj biljaka od početnog eksplantata. Kako bi dobili potpunu i funkcionalnu biljku, na umnoženim izdancima je potrebno potaknuti stvaranje korijena. Indukcija korijena je vrlo važna faza koja, kod nekih vrsta, može činiti velike probleme.

Stvaranje korijena *de novo* složen je mehanizam. Zašto se neke vrste zakorjenjuju lako, a druge s velikim poteškoćama, pitanje je na koje se još uvijek ne zna pravi odgovor. Jelaska (1994) navodi niz čimbenika koji utječu na zametanje i rast korijena u uvjetima *in vitro*:

- (I) starost i razvojni stadij biljke (stvaranje korijena lakše je u juvenilnom materijalu i u biljaka koje se razmnožavaju vegetativno u odnosu na one koje se razmnožavaju spolno)

- (II) vanjski utjecaji – kisik, svjetlost, temperatura (u agarskoj podlozi nema dovoljno kisika pa se izdanci bolje zakorjenjuju *in vitro* nego *ex vitro*; svjetlost općenito ima negativan utjecaj na zametanje korijena što znači da se izdanci u mraku lakše zakorjenjuju od onih na svjetlosti; viša temperatura pogoduje boljem zametanju adventivnog korijenja)
- (III) mineralne soli (potreba za makroelementima i mikroelementima ovisi o pričuvnim tvarima koje sadrži eksplantat)
- (IV) šećer (za stvaranje adventivnog korijenja u većem broju vrsta potrebne su velike koncentracije šećera)
- (V) regulatori rasta (većini biljaka za uspješno zakorjenjivanje potrebna je prisutnost auksina; najčešće se za zeljaste biljke upotrebljava slabi akusin IAA, dok su za drvenaste vrste potrebne više koncentracije djelotvornijih auksina poput IBA i NAA. Citokinini, giberelini i apscizinska kiselina većinom koče indukciju adventivnog korijenja.)
- (VI) pH vrijednost (iako utjecaj pH vrijednosti još nije detaljno istražen, neke vrste poput borovnice više vole niži pH)

1.4.4. Aklimatizacija aronije uzgojene u uvjetima *in vitro*

Biljke koje su uzgojene u uvjetima *in vitro* dosta se razlikuju od biljaka koje su uzgojene na klasičan način u prirodnim uvjetima. Biljke iz epruvete imaju slabo razvijenu kutikulu što je uzrokovano visokom vlagom u posudama za kultiviranje. Taj nedostatak uzrokuje velik gubitak vode isparavanjem kroz kutikulu kada se biljke jednom prenesu u supstrat tj. u uvjete gdje je atmosferska vlaga mnogo niža (Jelaska, 1994). Također, listovi biljaka uzgojenih *in vitro* vrlo su nježni i tanki te ne mogu dovoljno fotosintetizirati. Puči ne funkcioniraju normalno, najčešće su otvorene što uzrokuje velik gubitak vode u prvim satima aklimatizacije. Iako su biljke u uvjetima *in vitro* fotoautotrofne, one se djelomično prehranjuju heterotrofno. Presađivanjem u supstrat moraju preći na potpuno fotoautotrofan način života (odvijanje normalne fotosinteze) što za njih predstavlja određeni stres.

Aklimatizacija općenito predstavlja postupene odgovore organizma tijekom prilagodbe životu u novom okruženju ili na novonastale promjene u starom okruženju. Aklimatizacija biljaka uzgojenih u uvjetima *in vitro* na uvjete *ex vitro* postiže se tako da se biljke postepeno privikavaju na smanjenje relativne vlažnosti zraka. Biljke koje se prenose iz uvjeta *in vitro* moraju se redovito orošavati kako bi se postigla kontrolirana atmosferska vlažnost. Posljednjih godina u industrijskom mikrorazmnožavanju biljaka sustavi orošavanja ili

stvaranja magle postaju općenito prihvaćeni u aklimatizaciji biljaka (Jelaska, 1994). Također, biljke su podvrgnute slabijem intenzitetu svjetlosti i nižoj temperaturi.

Korijenje koje se zametnulo i razvilo u uvjetima *in vitro* većinom je ranjivo i ne pokazuje pravilno funkcioniranje u uvjetima *ex vitro* pa često mora biti zamijenjeno korijenom koje se stvara u odgovarajućem supstratu (Jelaska, 1994). Kod nekih biljnih vrsta izdanci se prenose izravno u umjetni supstrat gdje se zakorjenjuju čime se štedi vrijeme i novac.

Svakodnevno se na tržištu pojavljuju novi supstrati koji omogućuju bolje preživljavanje i lakši uzgoj biljaka proizvedenih u uvjetima *in vitro*. Najčešće su to razni univerzalni supstrati za sobno i balkonsko bilje koji poboljšavaju rahlost zemlje, blago kisele do neutralne pH vrijednosti (6,5 – 7). Sastav im je većinom mješavina treseta (bijelog i crnog) i usitnjenog vulkanskog kamenja (perlit, pumice) uz dodatak prirodnih organskih gnojiva te makro- (C, N, P₄O₁₀, K₂O) i mikroelemenata (Cu, Zn, Mo, Ni, Cd, Pb, Cr, Hg, Co, Ar).

1.5. Dosadašnja istraživanja vrste *Aronia melanocarpa* Michx.

Aronija je tek nedavno privukla veću pozornost te je još nedovoljno istražena. Jeppsson (2000) je proučavao kako se tijekom godina mijenja količina antocijana u vegetativnim biljkama i plodovima. Litwińczuk (2002) je razmnožavao aroniju u uvjetima *in vitro* na krutoj i tekućoj (2-faznoj) hranjivoj podlozi pri čemu je istraživao kako dodatak aminokiselina (arginina i kazeina) te auksina (IBA) utječe na zakorjenjivanje.

Dr. David Siegler na Sveučilištu u Illinoisu trenutno je uključen u istraživanje vezano za procjenu utjecaja aronije na zdravlje, dok dr. Bernardine Strik u Odjelu za istraživanje North Willamette u Oregonu proučava varijetete aronije da bi odredio koji ima najbolju kvalitetu i produktivnost. Tom Plocker u Minnessoti eksperimentirao je miješanjem aronije da bi poboljšao boju, stupanj tanina i šećera u vinu napravljenom od grožđa, a također je isprobavao europsku metodu cijepljenja mladica aronije na panjeve oskоруše (*Sorbus domesticus*) (www.borovnicaunas.hr).

II. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio uspostaviti sustav brzog i učinkovitog zakorjenjivanja izdanaka crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.) razmnoženih u uvjetima *in vitro* i njihove aklimatizacije na uvjete *ex vitro*. U tu svrhu istraženo je zakorjenjivanje u uvjetima *in vitro* na hranjivoj podlozi MS s različitom koncentracijom makroelemenata (MS, $\frac{1}{2}$ MS i $\frac{1}{4}$ MS) te različitim koncentracijama NAA i IBA (0; 1,0; 1,5 i 2,0 mg/L) ili bez hormona. Zakorijenjeni izdanci presađeni su u dva različita supstrata (komercijalni COMPO SANA i pripremljeni – mješavina tenisita, pumice i treseta) u svrhu određivanja postupka za što uspješniju aklimatizaciju. Također je istražena mogućnost istovremenog zakorjenjivanja i aklimatizacije izdanaka aronije u uvjetima *ex vitro* na supstratima korištenim za aklimatizaciju.

III. MATERIЈALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Početni eksplantati dobiveni su uvođenjem steriliziranih bočnih pupova grančica aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.) u kulturu *in vitro*. Površinska sterilizacija provedena je s ciljem da se sa površine eksplantata biljke uklone mikroorganizmi koji bi, prilikom uvođenja eksplantata u kulturu *in vitro*, mogli kontaminirati hranjivu podlogu (Pintarić, 2008).

U istraživanju zakorjenjivanja i aklimatizacije kao biljni materijal korišteni su izdanci crnoplodne aronije prethodno umnoženi u uvjetima *in vitro*.

3.2. METODE

3.2.1. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima *in vitro* i aklimatizacija

Preliminarni pokusi zakorjenjivanja u uvjetima *in vitro* su provedeni na podlozi MS (Murashige i Skoog, 1962; Tablica 1) s punom (MS), polovičnom ($\frac{1}{2}$ MS) te $\frac{1}{4}$ koncentracije makroelemenata ($\frac{1}{4}$ MS). Najpovoljnijom se pokazala podloga $\frac{1}{2}$ MS koja je korištena za daljnja istraživanja. Osnovnoj podlozi dodavala sam 8 g/L agara i 30 g/L saharoze te različite koncentracije auksina IBA i NAA (0; 1,0; 1,5 i 2,0 mg/L). Svaki pokus je proveden u 24 replike (po 12 u 2 neovisna pokusa).

Vrijednost pH hranjive podloge podesila sam na 5,7. Podlogu sam razlila u epruvete (30 x 120 mm), začepila vatom i aluminijskom folijom te autoklavirala 18 minuta pri tlaku 0,15 MPa i temperaturi od 120 °C. Nakon autoklavliranja hranjive podloge su čuvane u sterilnoj komori do početka pokusa.

Laboratorijski pribor sam sterilizirala autoklavliranjem pri tlaku 0,15 MPa i temperaturi od 120 °C u trajanju od 45 minuta, a metalni pribor (skalpeli, pincete) neposredno prije upotrebe uranjanjem u 96%-tni etanol i spaljivanjem na plameniku.

Pojedinačne izdanke sam nasađivala u epruvete u aseptičkim uvjetima u komori s horizontalnom strujanjem sterilnog zraka (laminar). Kulture sam inkubirala u klima-komori na temperaturi $24 \pm 2^\circ\text{C}$ uz 16-satno osvjetljenje bijelom svjetlošću od 40 W (fluorescentne cijevi, $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tablica 1. - Sastav osnovne hranjive podloge MS, kojoj je dodano 30 g/L saharoze i 8 g/L agara.

MAKROELEMENTI	mg/L	μM
KNO ₃	1900	18,80
NH ₄ NO ₃	1650	20,60
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	2,99
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	1,50
MIKROELEMENTI		
H ₃ BO ₃	6,2	100,0
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	1,0
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,1
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3	100,0
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6	29,9
Na ₂ EDTA	37,3	100,0
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	100,0
ORGANSKI DODACI		
glicin	2,0	26,6
m-inozitol	100,0	550,0
nikotinska kiselina	0,5	4,1
piridoksin - HCl	0,5	2,4
tiamin - HCl	0,1	0,3

Nakon zakorjenjivanja, biljke s najbolje razvijenim korijenjem prebačene su iz epruveta (uvjeti povišene vlažnosti zraka) u uvjete *ex vitro* (atmosferski uvjeti vlažnosti zraka). Zakorijenjene biljke sam izvadila iz epruveta, isprala destiliranom vodom, osušila između listova filter papira te posadila u supstrat. Kao supstrate koristila sam komercijalni supstrat COMPO SANA (kvalitetna zemlja za sobno i balkonsko bilje, pH 5,5 – 6,5; COMPO GmbH & CO, Njemačka) i mješavinu supstrata (tenisita (ciglana prašina za teniska igrališta), pumice i perlita). Supstrat sam stavila u Petrijeve posude (60 x 220 mm). U svaku posudu posadila sam po 12 biljaka te ih pokrila poklopcem. Pokus sam ponovila dva puta. Biljke su nakon nasađivanja na supstrate inkubirane u klima-komori pri temperaturi $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ uz 16-satno osvjetljenje bijelom svjetlošću od 40 W (fluorescentne cijevi, $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Postupak aklimatizacije proveden je po sljedećem protokolu:

1. prvi tjedan posude su bile otklopljene 1-2 h dnevno
2. drugi tjedan posude su bile otklopljene 3-4 h dnevno
3. treći tjedan posude su bile otklopljene 7-9 h dnevno
4. četvrti tjedan posude su bile stalno otklopljene

Tijekom postupka aklimatizacije biljke su svakodnevno prskane destiliranom vodom.

3.2.2. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima *ex vitro* i aklimatizacija

Osim u uvjetima *in vitro*, zakorjenjivanje sam provela i u uvjetima *ex vitro*. Umnožene izdanke aronije bez korijena izvadila su iz epruveta, isprala destiliranom vodom i osušila između listova filter papira. Neposredno prije nasađivanja na istraživane supstrate, bazu izdanka uronila sam u komercijalni supstrat za zakorjenjivanje Seradix B (Kwizda, Austria).

Kao supstrate u pokusima zakorjenjivanja *ex vitro* koristila sam komercijalni supstrat COMPO SANA (kvalitetna zemlja za sobno i balkonsko bilje, pH 5,5 – 6,5; COMPO GmbH & CO, Njemačka) i mješavinu supstrata (tenisita, pumice i treseta).

Po 24 biljke (12 u 2 neovisna pokusa) nasadila sam u Petrijeve posude (60 x 220 mm) te ih pokrila poklopcem. Biljke su nakon nasađivanja na supstrate inkubirane u klima-komori pri temperaturi $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ uz 16-satno osvjetljenje bijelom svjetlošću od 40 W (fluorescentne cijevi, $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Postupak aklimatizacije bio je jednak kao za biljke dobivene u uvjetima *in vitro*, a tijekom postupka zakorjenjivanja i aklimatizacije biljke su svakodnevno prskane destiliranom vodom.

3.2.3. Statistička obrada rezultata

Svaki rezultat aritmetička je sredina 24 replike dobivene iz 2 neovisna pokusa. Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je kao standardna pogreška.

Za statističku analizu podataka koristila sam analizu varijance (ANOVA) i Newman-Keulsov test za utvrđivanju značajnosti razlika između pojedinih tretmana na razini $P < 0,05$. Analize sam izvela pomoću računalnog programa Statistica 8.0. (Stat Soft Inc., SAD).

IV. REZULTATI

4.1. Odabir osnovne hranjive podloge

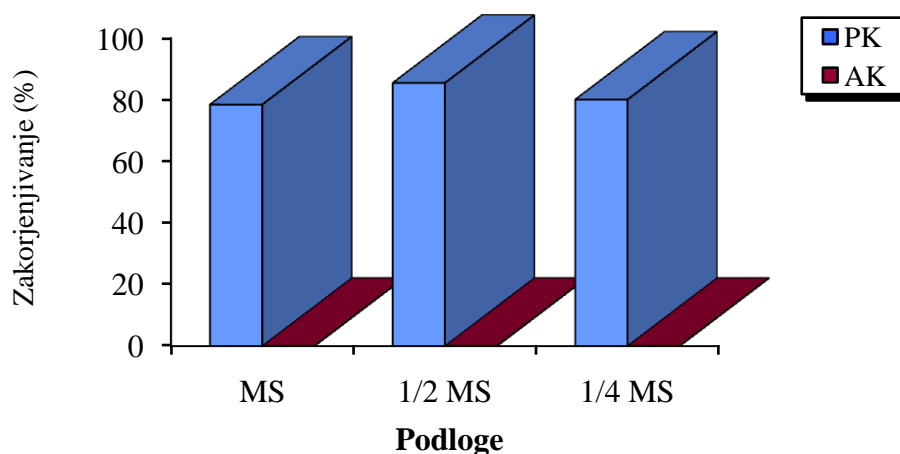
Prethodno multiplicirane izdanke vrste *Aronia melanocarpa* Michx. nasađivala sam na hranjivu podlogu MS koja je sadržavala (I) punu koncentraciju makroelemenata – podloga MS, (II) polovičnu koncentraciju makroelemenata – podloga $\frac{1}{2}$ MS i (III) $\frac{1}{4}$ koncentracije makroelemenata - podloga $\frac{1}{4}$ MS .

Rezultati su pokazali da zakorjenjivanje izdanaka ovisi o koncentraciji makroelemenata u hranjivoj podlozi (Slika 7). Najviši postotak zakorjenjenih izdanaka uočila sam na $\frac{1}{2}$ MS podlozi (85,4%). Na podlozi koja je sadržavala $\frac{1}{4}$ makroelemenata ($\frac{1}{4}$ MS) uspješno se zakorjenilo 80% izdanaka. Na podlozi s punom koncentracijom makroelemenata zabilježen je najmanji postotak zakorjenjivanja (78,4%).

Uspoređujući morfološke karakteristike zakorjenjenih biljaka na sve tri istraživane podloge, najrazvijenije su bile biljke uzgajane na $\frac{1}{2}$ MS podlozi (Tablica 2).

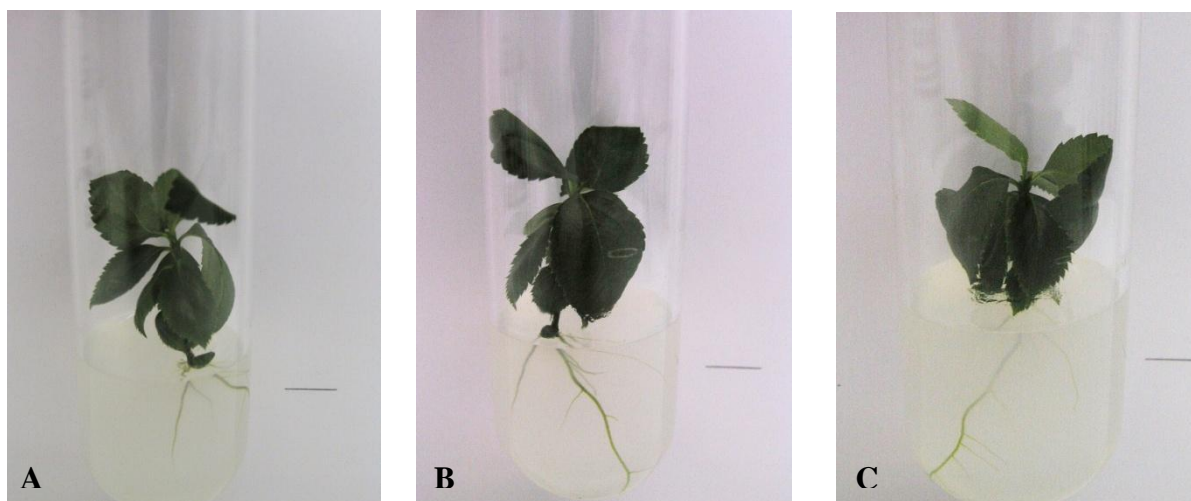
Tablica 2. – Usporedba morfoloških značajki zakorjenjenih biljaka na tri istraživane podloge

	MS	$\frac{1}{2}$ MS	$\frac{1}{4}$ MS
Dužina izdanka	2,5 cm	3 - 3,5 cm	2,5 - 3 cm
Veličina listova	1 x 1,8 cm	1,5 x 1 cm	1,5 x 1 cm
Razvoj kalusa	ne	ne	ne
Dužina primarnog korijena	2 - 4 cm	4 cm	3 - 4 cm
Razvoj adventivnog korijena	ne	ne	ne



Slika 7. - Stvaranje primarnog (PK) i adventivnog (AK) korijenja u izdancima aronije tijekom 2 supkulture na hranjivim podlogama MS, $\frac{1}{2}$ MS i $\frac{1}{4}$ MS. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost (n=24), a standardne pogreške iznose do 10% srednjih vrijednosti

Viši postotak zakorjenjivanja te bolje morfološke značajke zakorjenjenih biljaka na $\frac{1}{2}$ MS (Slika 8) bile su smjernica za daljnje istraživanje zakorjenjivanja, koje je nastavljeno na $\frac{1}{2}$ MS podlozi uz dodatak različitih koncentracija auksina NAA i IBA.

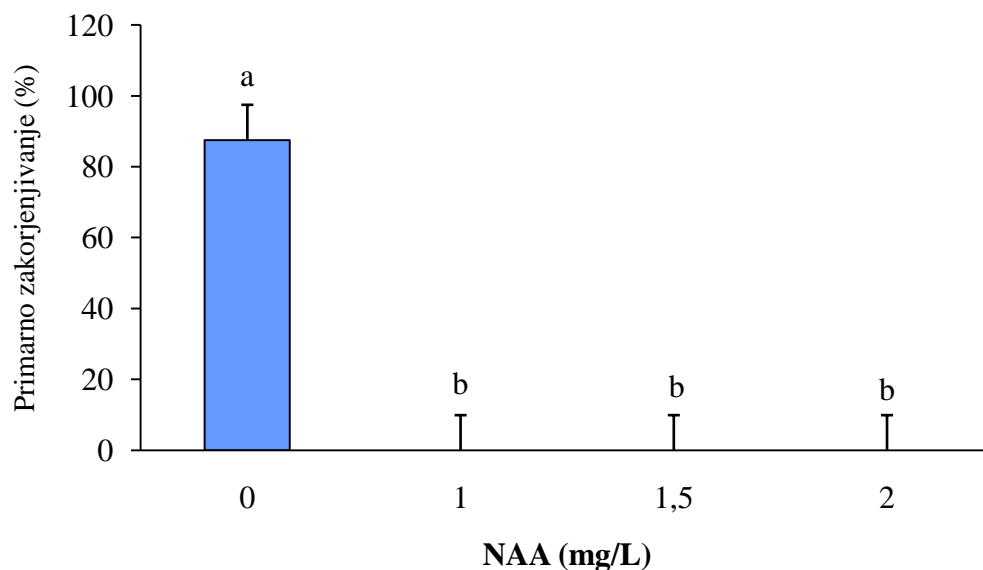


Slika 8. - Morfološke značajke zakorjenjenih izdanaka aronije nakon uzgoja na hranjivim podlogama MS (A), $\frac{1}{2}$ MS (B) i $\frac{1}{4}$ MS (C).

4.2. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima *in vitro*

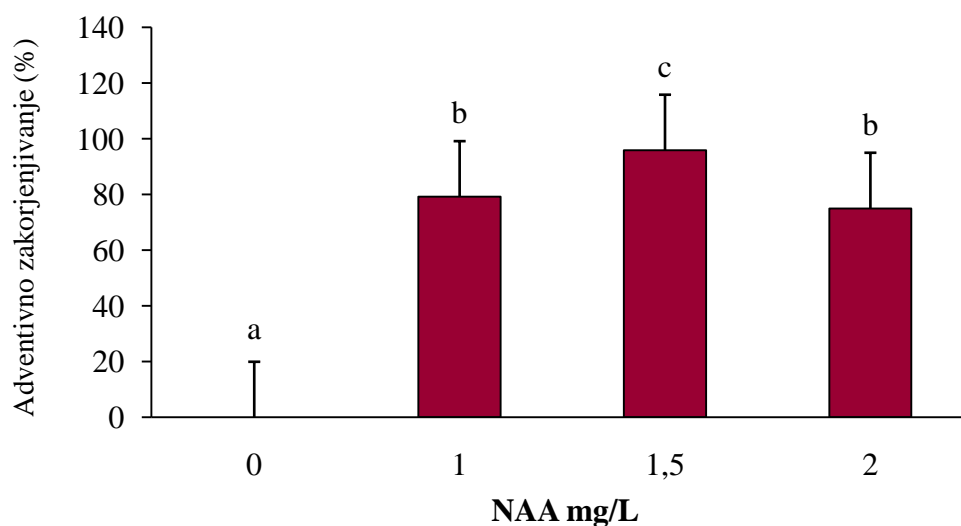
Stvaranje primarnog i adventivnog korijenja u uvjetima *in vitro* pratila sam na prethodno umnoženim izdancima aronije, koje sam nasadila na $\frac{1}{2}$ MS podlogu uz dodatak auksina NAA (1,0; 1,5 i 2,0 mg/L) i IBA (1,0; 1,5 i 2,0 mg/L) ili bez auksina.

Nakon 30 dana uzgoja na $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez dodatka NAA u 85,4% biljaka uočeno je dobro razvijeno primarno korijenje. Dodatak NAA u podlogu rezultirao je potpunim odsustvom primarnog korijenja (Slika 9).

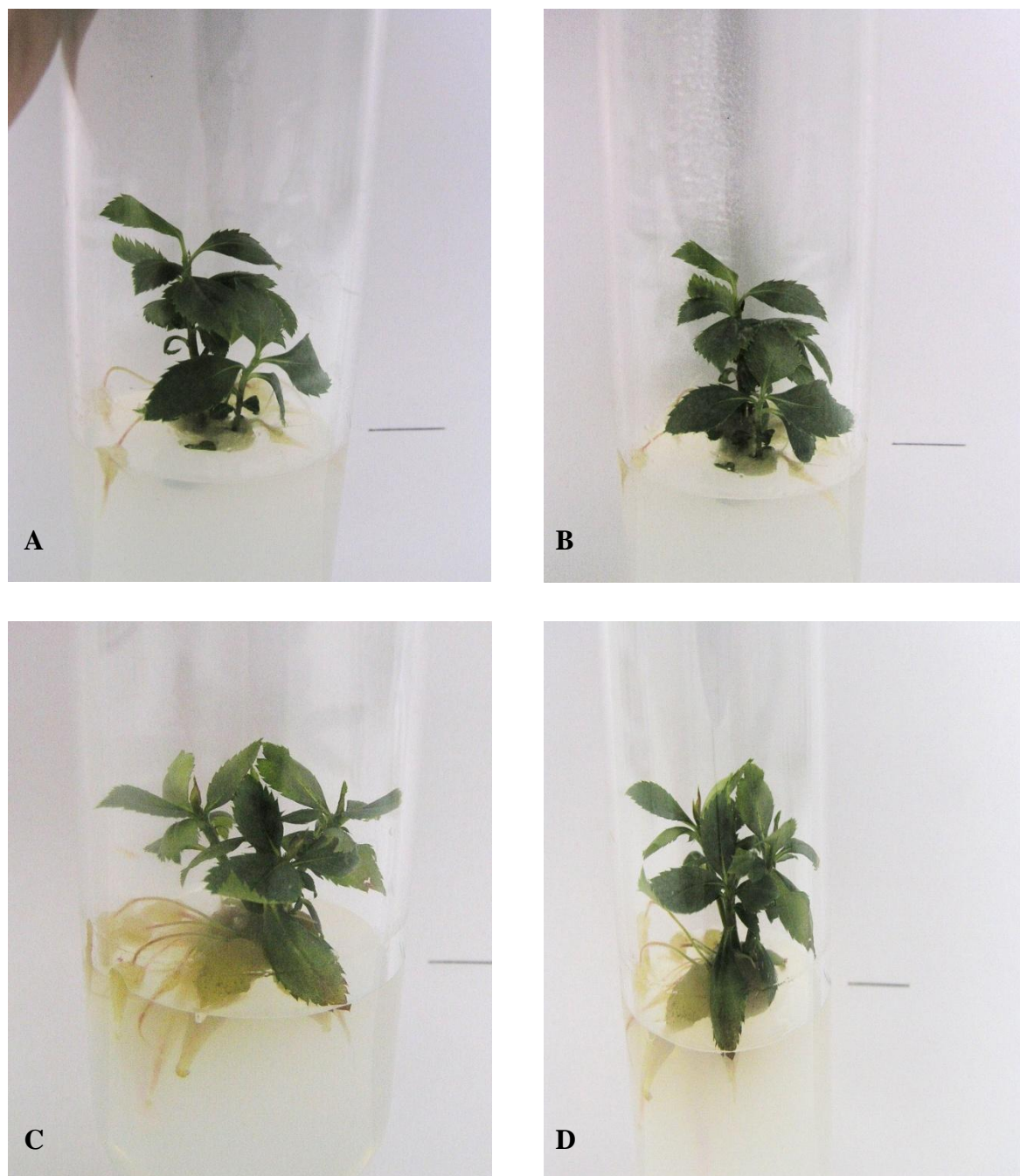


Slika 9. Razvoj primarnog korijenja na ½ MS podlozi s dodatkom različitih koncentracija NAA

Za razliku od primarnog, adventivno korijenje razvijeno iz kalusnog tkiva bilo je prisutno samo na izdancima aronije uzgojenih na podlozi koja je sadržavala NAA. Adventivno se korijenje najobilnije stvaralo na podlozi s dodatkom 1,5 mg/L NAA (u 95,8% izdanaka; Slika 10). U prosjeku se razvilo od 3 do 8 adventivnih korijenčića dužine 0,4 do 0,7 cm.



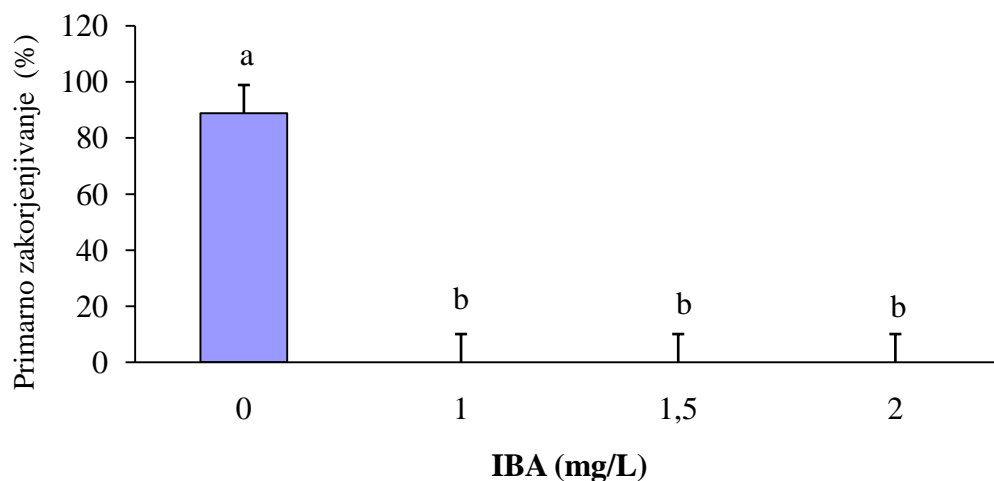
Slika 10. Razvoj adventivnog korijenja na ½ MS podlozi s dodatkom različitih koncentracija NAA



Slika 11. Razvoj adventivnog korijenja iz kalusa na izdancima aronije uzgojene na podlozi (A) $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L NAA, (B) $\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/L NAA, (C) $\frac{1}{2}$ MS + 1,5 mg/L NAA, (D) $\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/L NAA

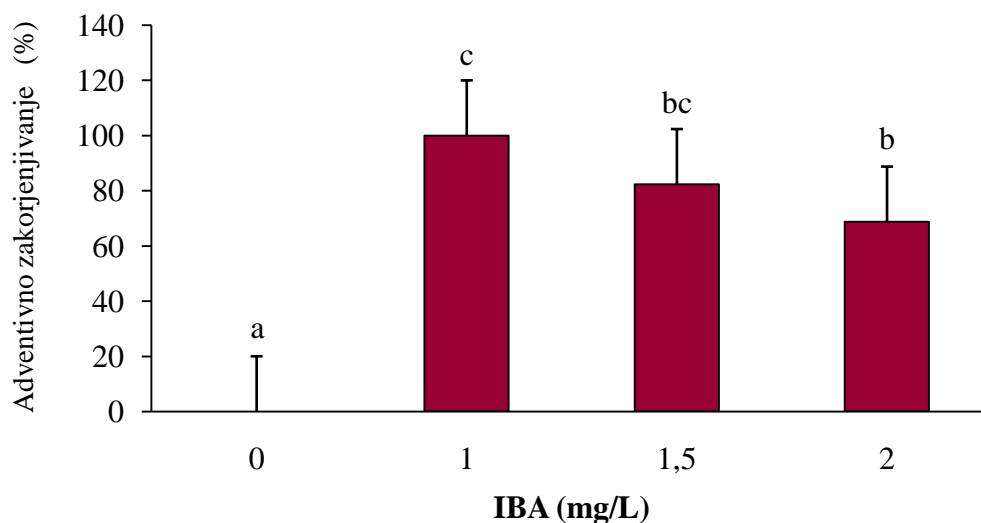
Također je istraženo zakorjenjivanje prethodno umnoženih izdanaka aronije na $\frac{1}{2}$ MS podlozi uz dodatak IBA (1,0; 1,5 i 2,0 mg/L).

Slično kao u tretmanu s NAA, stvaranje primarnog korijenja bilo je prisutno samo na izdancima koji su rasli na podlozi bez IBA. Dodatak IBA u hranjivu podlogu u potpunosti je inhibirao stvaranje primarnog korijenja (Slika 12).



Slika 12. Razvoj primarnog korijena na $\frac{1}{2}$ MS podlozi s dodatkom različitih koncentracija IBA

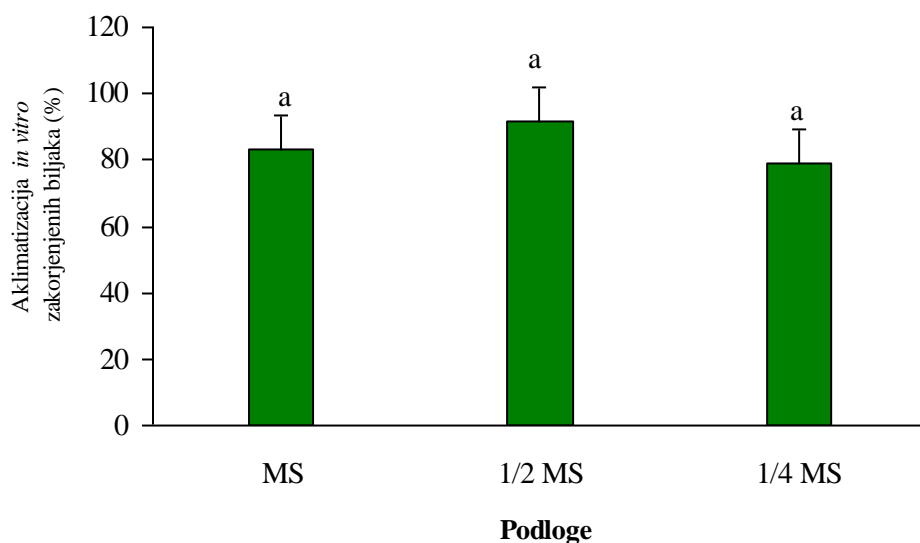
Razvitak adventivnog korijenja iz kalusa bio je prisutan samo na podlogama s dodatkom IBA (Slika 13). Najobilnije stvaranje adventivnog korijenja uočeno je na izdancima uzgojenim na podlozi s 1 mg/L IBA (100%), gdje su se iz kalusnog tkiva razvili korjenčići dužine oko 1 cm. Razvoj adventivnog korijenja na podlogama s većom koncentracijom IBA bio je manji (70-80%), a korjenčići kraći (4-7 mm).



Slika 13. Razvoj adventivnog korijena na podlozi $\frac{1}{2}$ MS s dodatkom različitih koncentracija IBA

4.3. Aklimatizacija aronije zakorijenjene u uvjetima *in vitro*

Biljke s dobro razvijenim korijenovim sustavom presađene su iz sterilnih uvjeta *in vitro* u univerzalni supstrat za cvjetajuće biljke (COMPO SANA, pH 5,5 – 6,5). Biljke su pažljivo izvađene iz agara, isprane destiliranom vodom, osušene između listova filter papira te posađene u Petrijeve posude sa supstratom i poklopljene. Kako biljke uzgojene u uvjetima *in vitro* nemaju dobro razvijenu kutikulu, stomatalni aparat i korijenske dlačice, potrebno ih je postepeno navikavati (aklimatizirati) na uvjete *ex vitro*. To je postignuto postepenim uklanjanjem poklopca. Otvaranje poklopca bilo je kontrolirano i vremenski se produljivalo svakog tjedna. Biljke su svakodnevno prskane destiliranom vodom. Iz Slike 14. vidljivo je da su se biljke dobro aklimatizirale na atmosferske uvjete vlažnosti zraka. Čak 80-90% biljaka uspješno je aklimatizirano na uvjete *ex vitro*, neovisno o podlozi na kojoj su prethodno uzgojene (Slika 15).

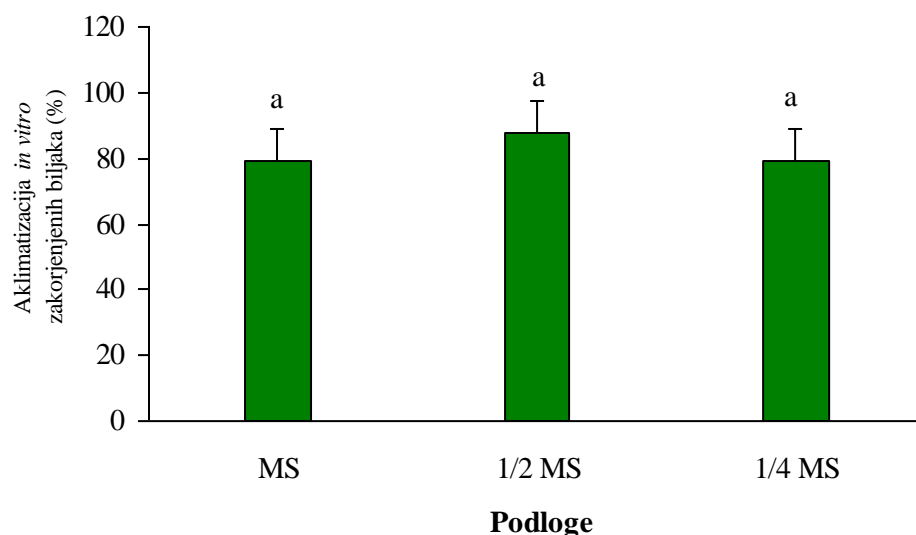


Slika 14. Aklimatizacija biljaka zakorijenjenih u uvjetima *in vitro*. Zakorijenjene biljke nasađene su na univerzalni supstrat COMPO SANA. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost aklimatizacije \pm SE (n=24).

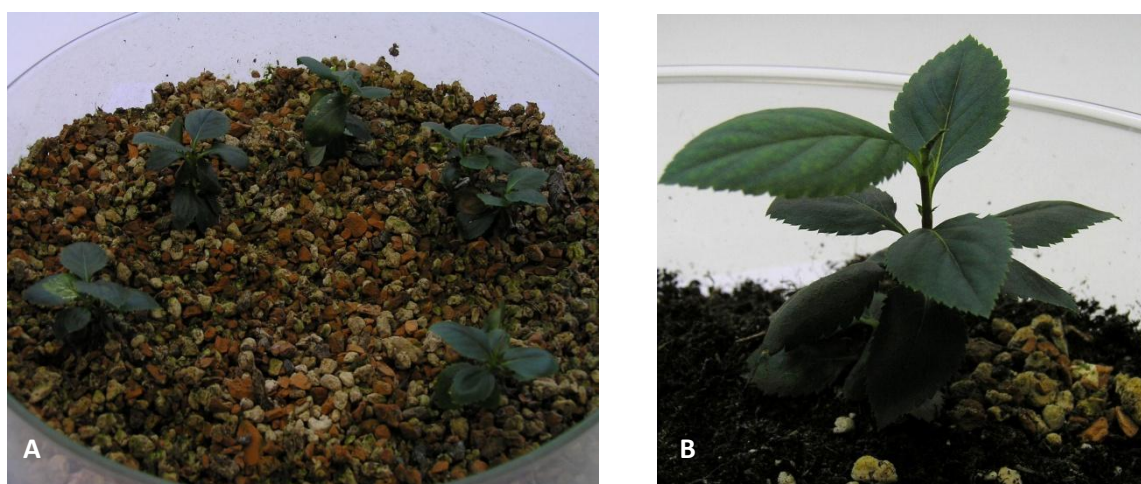


Slika 15. Aronija neposredno nakon sadnje u supstrat (a), te nakon 2 (b) i 4 tjedna (c) aklimatizacije

Biljke su, osim u čisti tresetni supstrat COMPO SANA, posađene i u mješavinu usitnjenog vulkanskog kamena (pumice), treseta i tenisita (ciglana prašina za teniska igrališta), u omjeru 3:3:1 (Slika 17). Postupak aklimatizacije zakorijenjenih biljaka proveden je isto kao i na tresetnom supstratu. Iz Slike 16. vidljivo je da je, bez obzira na kojoj hranjivoj podlozi je biljka zakorijenjena u uvjetima *in vitro*, veliki broj biljaka uspješno aklimatiziran na uvjete *ex vitro* (80-90%).



Slika 16. Aklimatizacija zakorjenjenih biljaka uzgojenih *in vitro* na smjesi pumice, treseta i tenisita. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost aklimatizacije \pm SE (n=24).



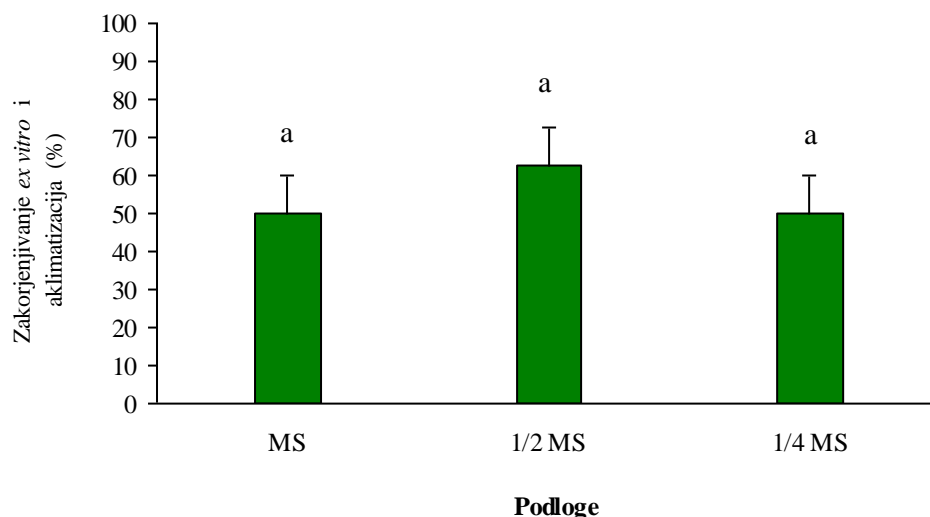
Slika 17. Aklimatizacija zakorjenjenih biljaka na smjesi pumice, treseta i tenisita nakon tjedan dana (a) i nakon 4 tjedna (b)

4.4. Zakorjenjivanje izdanaka aronije u uvjetima *ex vitro* i aklimatizacija

Osim aklimatizacije zakorjenjenih izdanaka, pokušala sam istovremeno zakorijeniti i aklimatizirati izdanke aronije uzgojene u uvjetima *in vitro*. Izdanci su izvađeni iz agara, isprani destiliranom vodom te osušeni između listova filter papira. Baza izdanka je uronjena u supstrat za zakorjenjivanje (Seradix B) te su izdanci posađeni u Petrijeve posude na tresetni supstrat (COMPO SANA) ili smjesu pumice, treseta i tenisita (3:3:1) i poklopljeni.

Postupak aklimatizacije proveden je na isti način kao i kod biljaka s razvijenim korijenom. Biljke su svakodnevno prskane destiliranom vodom.

Postupak istovremenog zakorjenjivanja i aklimatizacije prethodno umnoženih izdanaka bio je podjednako učinkovit kod svih izdanaka, neovisno o tome na kojoj su hranjivoj podlozi bili uzgojeni (Slika 18 i 19).

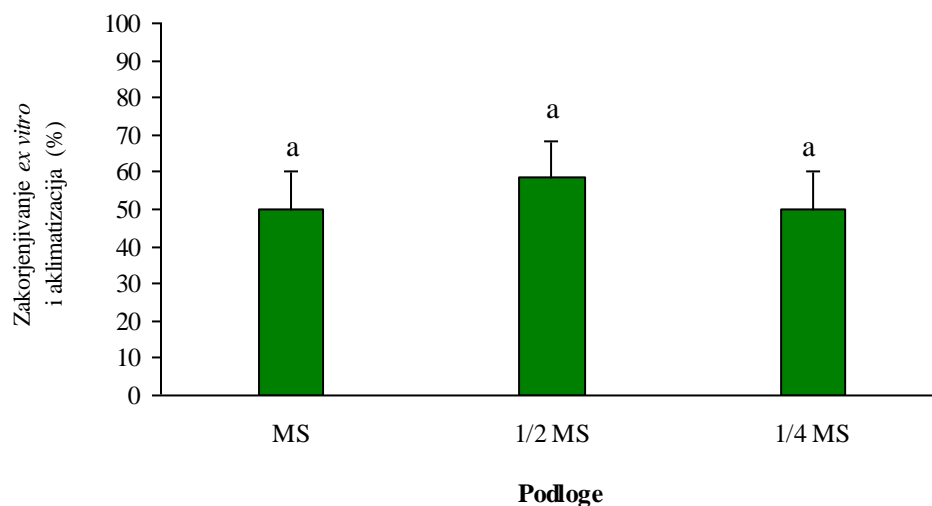


Slika 18. Istovremeno zakorjenjivanje i aklimatizacija izdanaka bez korijena na tresetnom supstratu COMPO SANA. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost aklimatizacije \pm SE (n=24).

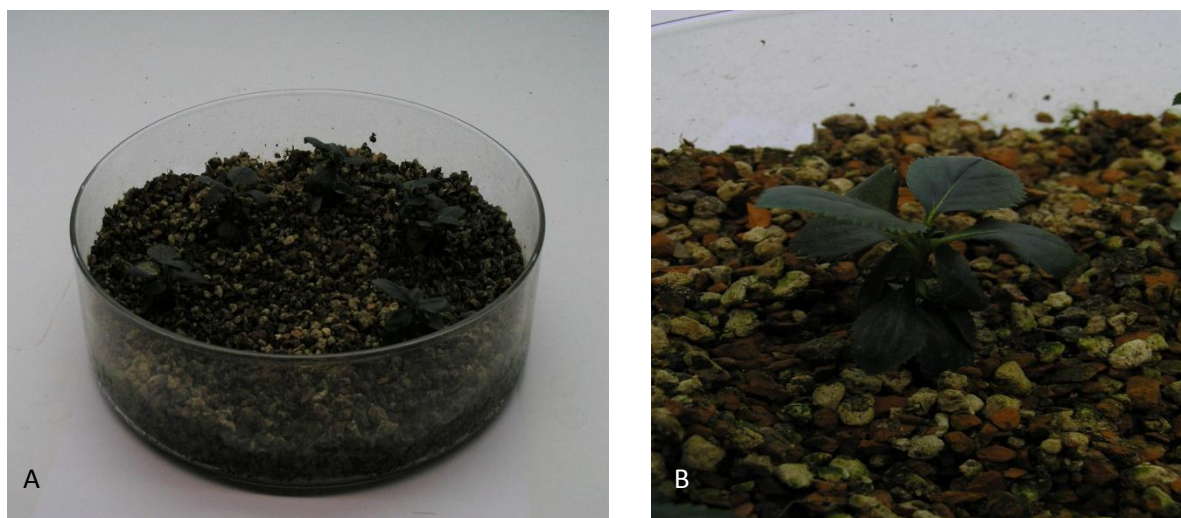


Slika 19. (A) Biljke aronije istovremeno zakorijenjene i aklimatizirane nakon 4 tjedna. (B) Potpuno aklimatizirane biljke nakon 2 (lijevo), 4 (u sredini) i 6 (desno) tjedana.

Istovremeno zakorjenjivanje i aklimatizacija bili su uspješni i na mješavini pumice, treseta i tenisita. Nakon 4 tjedna 50-60% biljka se u potpunosti prilagodilo na atmosferske uvjete važnosti zraka (Slike 20 i 21).



Slika 20. - Zakorjenjivanje i aklimatizacija biljaka bez korijena na mješavini pumice, treseta i tenisita



Slika 21. Istovremeno zakorijenjeni i aklimatizirani izdanci aronije na smjesi pumice, treseta i tenisita nakon 2 (A) i 4 tjedna (B).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je istovremeno zakorjenjivanje i aklimatizacija bilo manje učinkovito (50-60%) od postupka aklimatizacije već zakorijenjenih izdanaka (80-90%).

V. RASPRAVA

Metoda mikropropagacije temelji se na totipotentnosti biljne stanice te zadržavanju latentnog kapaciteta regeneracije biljke (George i Sherrington, 1984). Cilj kulture biljnoga tkiva je uzgoj stanica, organa ili čitavih biljaka na hranjivim podlogama u aseptičkim uvjetima *in vitro* (Jelaska, 1994). Zbog velike brzine razmnožavanja tijekom cijele godine u kontroliranim uvjetima rasta, mikropropagacija nudi gotovo savršeno rješenje za suvremenu rasadničku proizvodnju (Pintarić, 2008). Mikropropagacija je u prednosti pred tradicionalnim metodama razmnožavanja posebice kada se radi o uzgoju „teških“ te rijetkih i ugroženih vrsta, elitnih klonova sa superiornim rastom, otpornošću na bolesti i stres.

Metode mikropropagacije za brojne vrste voćaka iz roda *Prunus* (porodica *Rosaceae*) razrađene su već u prvoj polovici 70-ih godina 20. stoljeća. Za njihov uzgoj u uvjetima *in vitro* koristi se uglavnom podloga MS koja sadrži punu koncentraciju makro- i mikroelemenata, 3% saharoze i 0,8% agara (Walkey i Pink, 1988). Ipak, za pojedine vrste preporučuje se smanjenje koncentracije makroelemenata (George i Sherrington, 1984).

U svojem sam istraživanju usporedila uspješnost zakorjenjivanja crnoplodne aronije na podlozi MS s punom, polovičnom i sa svega 25% koncentracije makroelemenata. Petrović i Jačimović-Plavšić (1992) su najbolje zakorjenjivanje aronije postigli na podlozi s punom koncentracijom MS soli. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je stopa zakorjenjivanja bila je podjednako dobra na svim istraženim podlogama; nakon 4 tjedna zakorijenilo se 78-85% izdanaka. Kako su najviši postotak zakorjenjivanja (85%) te najbolje morfološke karakteristike uočene u biljaka na ½ MS podlozi, nastavak istraživanja proveden je upravo na podlozi s polovičnom koncentracijom makroelemenata.

U nastavku istraživanja pratila sam učinak egzogeno dodanih auksina indol-3-maslačne kiseline (IBA) te α -naftalenotene kiseline (NAA) (0; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L i 2,0 mg/L) na razvitak korijenja u izdancima crnoplodne aronije. Dobiveni rezultati su ukazali na potpunu inhibiciju stvaranja primarnog korijenja u aroniji izloženoj djelovanju egzogeno dodanih auksina. NAA i IBA potaknuli su samo stvaranja kalusa te razvitak adventivnog korijenja. Najobilnije stvaranje adventivnog korijenja postignuto je na izdancima uzgojenim na ½ MS podlozi s 1,0 mg/L IBA (adventivno korijenje razvilo se na 100% eksplantata) te na ½ MS podlozi s dodatkom 1,5 mg/L NAA (na 95,8% eksplantata). U slučaju crnoplodne aronije dodatak auksina, umjesto očekivane povećane stope zakorjenjivanja, potaknuo je stvaranje i proliferaciju kalusa te razvitak adventivnog korijenja već 9-14 dana nakon nasađivanja na podlogu. Adventivno korijenje vrlo je često nefunkcionalno te stoga nepoželjno.

Pretpostavljam da je u tom razdoblju došlo do razgradnje egzogenih auksina pomoću peroksidaza nakon čega je u kalusu vjerojatno došlo do stvaranje embriogenih nodula iz kojih se razvilo adventivno korijenje.

Litwińczuk (2002) je proučavao zakorjenjivanje crnoplodne aronije u uvjetima *in vitro* na podlozi $\frac{1}{2}$ MS s dodatkom saharoze (20 g/L), IBA (0; 1,5 i 3 g/L) i agara (6 g/L). Litwińczuk je najbolje zakorjenjivanje (u 76,9% izdanaka) dobio u izdancima uzgojenim na podlozi s dodatkom 1,5 g/L IBA, dakle na istom mediju gdje se i u mojim pokusima zakorijenilo 82,3% izdanaka. Razlika je u tome što se u mojim pokusima razvilo adventivno korijenje. Pošto Litwińczuk ne navodi radi li se o primarnom ili adventivnom korijenju, nemoguće je usporediti dobivene rezultate s njegovima. Litwińczuk je nadalje pratio i učinak aminokiselina arginina, prolina i hidrolizata kazeina (100 ili 200 mg/L) na zakorjenjivanje te najbolji rast korijena zapazio u podlozi s 200 mg/L arginina (u 93,8% izdanaka).

Kane i suradnici (1991) istraživali su mikropropagaciju i zakorjenjivanje crvene aronije (*Aronia arbutifolia* (L.) Pers.) na podlozi WPM (Woody Plant Medium). Uočili su da IBA potiče bolje zakorjenjivanje od NAA. Najveći postotak zakorjenjivanja uočen je na podlogama uz dodatak 1,0 mg/L IBA (84%), dok je dodatak 1,0 mg/L NAA potaknuo zakorjenjivanje samo 53% izdanaka. Međutim, autor ne navodi je li riječ o primarnom ili adventivnom korijenju. U svojem sam istraživanju primijetila višu stopu adventivnog zakorjenjivanja u biljaka tretiranih s 1,0 mg/L IBA (100%) dok je u biljaka tretiranih s 1,0 mg/L NAA zakorjenjeno svega 80% eksplantata.

Litwińczuk (2002) je u svojim pokusima uspio postići adaptaciju biljaka zakorjenjenih u uvjetima *in vitro* na uvjete *ex vitro* u svega 60% biljaka, što je nezadovoljavajuće obzirom da su na podlozi jednakog sastava Stenienne i sur. (1999) postigli 100%-tnu aklimatizaciju. Kane i suradnici (1991) su dokazali 100% aklimatizaciju zakorjenjenih izdanaka crvenoplodne aronije (*Aronia arbutifolia* (L.) Pers.) na komercijalnom supstratu Vergro Klay Mix A nakon 28 dana, neovisno o prethodnom tretmanu s NAA ili IBA.

U mojem istraživanju, aklimatizacija biljaka zakorjenjenih u uvjetima *in vitro* bila je prilično uspješna te je iznosila 80-90%, neovisno o supstratu u koji su biljke posađene. Biljke sam sadila u komercijalni univerzalni supstrat za biljke lončanice COMPO SANA i u pripremljenu mješavinu pumice, tenisita i treseta (3:3:1). Oba supstrata pokazala su se podjednako dobrima za uzgoj ove vrste. Biljke su se uspješno i brzo aklimatizirale na uvjete *ex vitro* što potvrđuje da su aktivirale fotosintezu i transpiraciju, poboljšale vaskularne veze

između izdanka i korijena, povećale zaštitini sloj kutikule te razvile korijenove dlačica (Pintarić, 2008).

Kako su se biljčice zakorjenjene u uvjetima *in vitro* iznimno dobro prilagođavale na vanjske uvjete vlažnosti zraka, pokušala sam isto učiniti i s izdancima uzgojenim u uvjetima *in vitro* koji nisu imali razvijeno korijenje. U tu svrhu sam bazu izdanaka prije sadnje u komercijalni tresetni supstrat te mješavinu pumice, treseta i tenisita (3:3:1) uronila u komercijalni supstrat za zakorjenjivanje Seradix B. Istovremeno zakorjenjivanje i aklimatizacija pokazali su se manje uspješnim nego aklimatizacija biljaka s već razvijenim korijenskim sustavom. Učinkovita aklimatizacija uz istovremeno zakorjenjivanje u uvjetima *ex vitro* postignuta je samo u 50-60% eksplantata, što je značajno manje od postotka aklimatizacije u biljaka s već razvijenim korijenom (80-90%).

Na temelju svega navedenog mogu zaključiti da je aronija prilično nezahtjevna vrsta koja se lako zakorjenjuje i aklimatizira. Iako zakorjenjivanje u uvjetima *ex vitro* štedi vrijeme jer ne zahtijeva proces zakorjenjivanja u uvjetima *in vitro*, ne preporuča se zbog prilično velikih gubitaka tijekom izvođenja zakorjenjivanja i aklimatizacije u jednom koraku.

VI. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata zakorjenjivanja i aklimatizacije crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* Michx.), zaključila sam sljedeće:

- Zakorjenjivanje multipliciranih izdanaka crnoplodne aronije ovisi o koncentraciji makroelemenata u hranjivoj podlozi – najviši postotak zakorjenjivanja uočen je na podlozi $\frac{1}{2}$ MS (85,4%), dok je na podlozi MS i $\frac{1}{4}$ MS zakorjenjivanje bilo nešto slabije (78,4% odnosno 80%).
- Najbolje morfološke značajke zakorjenjenih biljaka uočene su na hranjivoj podlozi s polovičnom koncentracijom makroelemenata ($\frac{1}{2}$ MS).
- Dodatak auksina NAA i IBA u različitim koncentracijama (1,0; 1,5 i 2 mg/L) u podlogu $\frac{1}{2}$ MS inhibirao je razvoj primarnog korijenja te potaknuo stvaranje kalusnog tkiva iz kojeg se razvijalo adventivno korijenje.
- Adventivno korijenje se u najvećem postotku razvijalo na podlozi $\frac{1}{2}$ MS s dodatkom 1,5 mg/L NAA (95,8%) i 1 mg/L IBA (100%).
- Aklimatizacija zakorjenjenih biljaka uzgojenih u uvjetima *in vitro* bila je uspješna (80-90%) na oba testirana supstrata (komercijalni supstrat COMPO SANA i smjesa tenisita, pumice i treseta) neovisno o podlozi na kojoj su biljčice prethodno uzgajane.
- Zakorjenjivanje izdanaka u supstratu COMPO SANA i smjesi pumice treseta i tenisita u uvjetima *ex vitro* uz istovremenu aklimatizaciju bilo je manje učinkovito (50-60%) od aklimatizacije biljaka prethodno zakorjenjenih u uvjetima *in vitro*.

VI. LITERATURA

George, E.F., Sherrington, P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Eversley, Basinstoke, Herts.

Jelaska, S., 1994. Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga, Zagreb

Jeppsson, N., 2000. The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking', Sci. Hort. 83: 127-137

Kane, M.E., Dehgan, B., Sheehan, T.J., 1991. *In vitro* propagation of Florida native plants: *Aronia arbutifolia*, Proc. Fla. State Hort. Soc. 104: 287-290

Litwińczuk, W., 2002. Propagation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Elliot) through *in vitro* culture. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Horticulture, 5(2)

Lloyd, G., McCown, B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip. Proc. Inter. Plant Prop. Soc. 29: 387-393

Mededović, S., Ferhatović, Dž., 2003. Klonska proizvodnja sadnica drveća i grmlja, Bemust, Sarajevo

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.

Netzel, M., Strass, G., Kaul, C., Bitsch, I., Dietrich, H., Bitsch, R., 2002. *In vivo* antioxidative capacity of a composite berry juice, Food Res. Int. 35: 213-216

Petrović, D.M., Jačimović - Plavšić, M. M., 1992. *Aronia melanocarpa* and propagation *in vitro*,. In vitro culture. XXIIIrd International Horticultural Congress, Florence, Italy, 30. August 1990. IHS Acta Hort. 300: 133-135

Pevalek - Kozlina, B., 2002: Fiziologija bilja, Školska knjiga, Zagreb

Pintarić, B., 2008. Mikropropagacija bijele topole (*Populus alba* L.), Šumarski list br.7 - 8, 343-354

Ružić, Đ., Cerović, R., 2002. Primena mikropropagacije voćaka *in vitro* u komercijalne svrhe, Zbornik naučnih radova, 8: 213-224

Steniene G., Stanys V., Bobinas C., Duchowski P., Merkys A., 1999. *In vitro* propagation of non-traditional horticultural plants (Actinidia, Chaenomeles, Aronia), Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 468: 441–443

Vorkapić-Furač, J. (2008). Biotehnološka primjena životinjskih i biljnih stanica, Laboratorij za primjenu stanica i biotransformacije, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1. predavanje

Walkey, D. G. A., Pink, D. A. C. (1988). Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and broccoli (*B. oleracea* var. *italica*). U: Bajaj, Y. P. S. (ur.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 6, Crops*, Springer-Verlag, Berlin str. 252-276

Internet stranice:

www.aronija.com.hr

www.antioxidant-fruits.com

www.borovnicakunas.hr

www.wikipedia.com

VII. PRILOZI

Od bobica aronije mogu se napraviti odlični frapei. Samo ih je potrebno dodati bilo kojem soku, voćnom sladoledu ili omiljenom jogurtu. Mogu se staviti na hladne i tople pahuljice ili dodati palačinkama. Možete ih koristiti kao zamjenu u drugim receptima kao što je umak od brusnice ili muffini s borovnicama. Odlične su i u voćnim salatama. Samo budite kreativni.

Neki od receptata koje možete isprobati:

1) Kompot od aronije

Potrebno:

1 kg zrelih plodova aronije
1 kora cimeta
30 dkg smeđeg šećera
5 dl vode



Priprema:

Vodu prokuhati u loncu, dodati šećer i cimet te miješati da se šećer otopi. Oprane i ocijeđene plodove staviti u šećerni sirup i kratko prokuhati, a zatim vaditi manjim cjedilom i stavljati u sterilne bočice do 1 cm od vrha. Sirup još jednom prokuhati, izvaditi cimet i dopuniti bočice. Hermetički zatvoriti i čuvati na tamnom i hladnom mjestu (najmanje dva tjedna) prije upotrebe.

2) Kruh s aronijom

Potrebno:

2 šalice brašna
1 1/2 čajne žličice praška za pecivo
1 čajna žličica soli
1/2 čajne žličice sode
1 jaje
1/8 šalice maslaca
3/4 šalice soka od naranče
1 šalice šećera
1 šalice bobica aronije ili 1 šalice soka
1 šalice oraha

Pomiješajte brašno, prašak za pecivo, sol i sodu. U mikser stavite jaje, maslac, sok od naranče i šećer. Dodajte bobice ili sok aronije i kratko uključite mikser. Stavite sadržaj u smjesu s brašnom i miješajte rukom. Pecite na namašćenom limu (9x5") na temperaturi od 350F (180 °C) oko 50 do 60 minuta.

3) Džem od aronije

3.a) Za 9 - 10 čaša potrebno je:

- 1,6 kg bobica aronije
- 3 čaše vode
- 6,5 šalice šećera
- 1 tekući pektin (želatina)



Oprane bobice aronije odvojite od peteljki i koštica. Stavite u lonac s 3 šalice vode, na vatru i istisnuti preostali sok. Izmjerite 3 šalice soka i stavite na veliku tavu. Za jaču aromu dodati 1/4 čajne žličice ekstrakta badema. Soku dodati šećer i dobro izmiješati. Staviti na vatru da zakipi, stalno miješajući. Dodajte pektin (želatinu) i ostavite da kipi 1 minutu, stalno miješajući. Maknite s vatre, pokupite pjenu žlicom i brzo ulijte u sterilizirane staklenke i zatvoriti. Količina je dostatna za 9 srednjih čaša ili staklenki.

3.b) Za 3 čaše soka potrebno je:

- 1,6 kg zrelih bobica aronije
- 6,5 šalice šećera
- 1 tekući pektin (želatina)

Odvojite bobice aronije od peteljke te ih operite. Stavite u lonac s vodom, zatim na vatru i lagano kuhajte 15 minuta. Odvojite sok, izmjerite 3 čaše i pomiješajte sa šećerom. Slijedite standardnu proceduru za pripremu džema s tekućim pektinom (želatina).

Recepti preuzeti sa:

<http://www.bezgluten.net/content/jagodasto-vo%C4%87e>

<http://www.antioxidant-fruits.com/aronia-berry-recipes.html>

<http://winemaking.jackkeller.net/aronia.asp>